

VACCINATION ANTISALMONELLIQUE
AU MOYEN DE GERMES VIVANTS,
STREPTOMYCINO - DEPENDANTS;
ESSAIS SUR SOURIS AVEC *Salmonella typhimurium*

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Ion-Rusan VLADOIANU

Thèse No 3504

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

**VACCINATION ANTISALMONELLIQUE
AU MOYEN DE GERMES VIVANTS,
STREPTOMYCINO - DEPENDANTS;
ESSAIS SUR SOURIS AVEC *Salmonella typhimurium***

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Ion-Rusan VLADOIANU



Thèse No 3504

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1976

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Robert H. Regamey, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 17 mai 1976

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 3504



— A Monsieur le Professeur R. H. REGAMEY

Pour l'intérêt et les encouragements qu'il nous a manifestés dans la conduite de ces recherches, qu'il sache notre respectueux et fidèle attachement à Sa personne.

— A Monsieur le Professeur E. TRABUCCHI de l'Université de Milan

Pour le soutien et l'attention qu'il a apportés à nos travaux, qu'il soit assuré de notre profonde gratitude.

A LA MEMOIRE DU DOCTEUR G. MAGHERU,
ancien directeur du Département des vaccins
de l'Institut Cantacuzino de Bucarest

TABLE DES MATIERES

I.	Introduction	9
II.	Le problème de la réversion vers une forme virulente; expérimentation sur souris CD-1 avec <u>S. typhimurium</u>	13
	Matériel et méthodes	13
	Résultats	14
	Discussion	18
III.	Modèle expérimental de vaccination orale sur des souris C57 BL/6 avec <u>S. typhimurium</u>	23
	Matériel et méthodes	23
	Résultats	24
	Discussion	24
IV.	Efficacité de la vaccination orale avec <u>S. typhimurium</u> chez la souris C57 BL/6. Essai de vaccination mixte : orale et sous-cutanée	26
	Matériel et méthodes	26
	Résultats	26
	Discussion	27
V.	Résumé et conclusions	30
VI.	Bibliographie	32

Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. INTRODUCTION

L'utilisation des vaccins antityphoïdiques remonte à plus de 75 ans, période pendant laquelle on a accumulé une riche expérience : de nombreuses méthodes de préparation ont été proposées; on a aussi étudié la possibilité d'administrer les vaccins par différentes voies et cherché les moyens d'évaluer leur efficacité. Les formules de préparation et les modes d'administration connus ne sont ni satisfaisants, ni unanimement acceptés, d'où la nécessité de continuer les efforts en vue d'améliorer les résultats positifs déjà acquis. Les informations disponibles concernent surtout les vaccins à germes tués; celles qui se rapportent aux vaccins à germes vivants sont récentes et rares.

A. Vaccins à germes tués

Méthodes de préparation. Ces méthodes relèvent de deux catégories distinctes: les unes s'appliquent à l'élaboration de vaccins constitués par des corps bactériens entiers (il s'agit de vaccins dits corpusculaires); les autres visent à l'obtention d'extraits bactériens. Les vaccins corpusculaires se sont montrés supérieurs aux extraits bactériens; les vaccins renfermant des germes inactivés par la chaleur et phénolés ou surtout inactivés et desséchés par l'acétone se sont imposés en général. Malgré la préférence qui leur est accordée, ces antigènes ne satisfont guère parce qu'ils engendrent une immunité faible et de courte durée; de plus, ils provoquent des effets secondaires indésirables lors de leur administration par voie parentérale.

Voies d'administration. Deux parmi elles ont gagné du terrain : la voie sous-cutanée et la voie orale.

La voie sous-cutanée est couramment utilisée dans les armées et la population civile des régions d'endémie, mais elle n'est pas exempte d'inconvénients. A cause de l'intensité des réactions postvaccinales qu'elle engendre, elle est mal acceptée par la population. Ses contre-indications sont nombreuses; on a même relevé que l'injection sous-cutanée pouvait déclencher une hépatite d'inoculation. Dans le but de réduire ou même d'éliminer ces déficiences, on a tenté soit de modifier le procédé de préparation du vaccin, soit de diminuer le nombre des inoculations, soit enfin de recourir à d'autres voies d'administration. Parmi ces solutions, celle qui vise à substituer la voie orale à la voie sous-cutanée semble la plus prometteuse.

En effet, la voie orale ne provoque que des réactions secondaires insignifiantes. Les germes introduits dans l'organisme empruntent un trajet qui se rapproche de celui des infections à salmonelles. Or, l'emploi de cette voie fut longtemps contesté, car il était difficile d'établir sérologiquement l'efficacité des germes tués introduits par la bouche. Toutefois, les découvertes faites au cours des dix dernières années sur l'immunité dans le tractus gastro-

intestinal, en particulier sur l'importance des IgA, puis le développement récent de vaccins à germes vivants atténués, ont donné un regain d'intérêt à la prophylaxie par voie orale.

Evaluation de l'efficacité. Les difficultés qui surgissent à ce propos sont multiples. Nous relèverons parmi elles la quasi-impossibilité d'impliquer l'homme lui-même dans un test de virulence, puis l'absence d'un animal d'expérience bon marché, facilement accessible et susceptible de reproduire le tableau clinique de la fièvre typhoïde humaine après ingestion de Salmonella typhi. Des essais "in vitro" et "in vivo" sont néanmoins couramment utilisés en laboratoire. Dans les titrages d'anticorps sériques chez le lapin vacciné, dans les tests de protection active ou passive sur la souris, l'interprétation des résultats reste entachée d'arbitraire, car les conclusions de l'essai sur l'animal ne sont pas nécessairement valables pour l'homme. Le test de séroprotection sur embryon de poulet, tel qu'on l'utilise pour le titrage des sérums d'individus vaccinés, semble le moins criticable vu l'extrême sensibilité de l'embryon de poulet pour les salmonelles, mais sa valeur n'en est pas moins relative : on ne reproduit pas sur l'animal d'expérience les symptômes de la fièvre typhoïde. Quant aux tests d'antigénicité pratiqués sur l'homme lui-même, ils sont aussi décevants; en effet, il n'y a pas d'étroite corrélation entre le taux des anticorps sériques et le pouvoir protecteur.

Une meilleure évaluation semble réalisable sur le terrain par le test épidémiologique. Celui-ci consiste à vacciner des humains dans des régions où l'infection typhoïdique ou paratyphoïdique est endémique; on compare ensuite, à certains intervalles, le nombre de contaminations cliniquement apparentes qui surviennent dans les différents groupes de vaccinés. De tels essais sont coûteux, difficiles à organiser et, pour être significatifs, leurs résultats doivent répondre aux exigences statistiques; ceux qui furent exécutés sous le patronage ou avec le concours de l'OMS dans plusieurs pays (Yougoslavie, Pologne, URSS, Guyane) ont confirmé dans une certaine mesure la capacité immunisante de certains vaccins corpusculaires à germes tués, en particulier du vaccin acétoné et du vaccin à germes inactivés par la chaleur et phénolé.

B. Vaccins à germes vivants

Des études assez récentes, faites sur des volontaires humains et sur des singes anthropoïdes (qui peuvent être infectés par voie orale) ont permis de préciser nos connaissances sur la pathogénie de la fièvre typhoïde et l'immunité antityphoïdique tant naturelle que postvaccinale.

L'emploi de germes vivants remonte à Besredka (1910, 1913), à Ciuca, Combiescu et Balteanu (1915); il fut longtemps considéré comme relevant du domaine des chimères et vraisemblablement impossible à réaliser dans la pratique courante : les risques apparaissaient trop élevés. Les développements de la génétique bactérienne ont provoqué un revirement d'opinion, soutenu par le succès du vaccin oral antipoliomyélitique à virus vivant. Un autre encouragement relève des succès constatés par l'utilisation, contre la dysenterie bacillaire, de vaccins à germes vivants manipulés génétiquement (18-20, 32-37, 41-45).

Comparés aux vaccins dits tués, les vaccins dits vivants ont plus de chances de conserver intact leur pouvoir immunogène parce qu'ils ne sont

soumis à aucun traitement physique ou chimique. De plus, en se multipliant chez l'hôte, le germe vivant est supposé produire un stimulus antigénique plus important et peut-être plus durable, vraisemblablement parce qu'il pénètre et se développe dans les organes ou tissus en cause dans l'infection naturelle.

Les progrès récents de la génétique bactérienne sont mis en oeuvre pour l'élaboration de vaccins constitués par des salmonelles vivantes. Différentes techniques permettent d'obtenir des antigènes possédant à la fois une innocuité raisonnable et une efficacité certaine (1-3, 11, 15-16, 21-23, 28, 39-40, 51, 56). Les souches streptomycino-dépendantes (SmD) semblent offrir de réels avantages. Le principe de leur emploi pour la vaccination antityphoïdique est le suivant : le sujet reçoit simultanément, par voie buccale, de la streptomycine et le mutant SmD; trouvant l'antibiotique à leur disposition, les germes pris en charge par les parois digestives se développent "in situ" aussi longtemps que le facteur de croissance dont ils ont besoin, c'est-à-dire la streptomycine, est présent. En supprimant l'administration de streptomycine, on interrompt automatiquement le développement des germes mais, entre-temps, les processus naturels de défense spécifique ont été amorcés.

Des observations favorables ont été faites ces dernières années sur des volontaires (14, 30, 31) avec la souche S. typhi 27V de Reitman (1967) et sur des chimpanzés (12) avec une variante de la même souche. Ces résultats représentent un important progrès; leur confirmation dans d'autres essais similaires suggérerait que l'emploi de souches SmD de salmonelles constitue une alternative valable pour la vaccination contre la fièvre typhoïde et d'autres salmonelloses.

L'usage de vaccins à germes vivants SmD soulève la question de l'invariabilité de l'avirulence : les souches de salmonelles doivent être suffisamment stables du point de vue génétique; elle doivent être incapables de réverter à une forme virulente (47). Or, les essais mentionnés plus haut laissent entendre que le vaccin antityphoïdique SmD employé est suffisamment stable, car aucune réaction significative ne fut observée chez les volontaires ou les chimpanzés.

Les études expérimentales que nous avons entreprises participent aux préoccupations actuelles. Elles sont consacrées d'une part au problème de la réversion des formes SmD soit "in vitro", soit "in vivo" et, d'autre part, à la mise au point d'un modèle expérimental facilement utilisable dans n'importe quel laboratoire; ce modèle, constitué par le couple Souris et Salmonella typhimurium, a pour but non seulement de permettre l'étude de la réversion, mais aussi et surtout d'établir l'efficacité des vaccins à germes vivants utilisés pour la vaccination par voie buccale.

C'est parce qu'il n'existe pas de modèle expérimental suffisamment accessible pour la reproduction de la fièvre typhoïde humaine, que nous abandonnerons les essais avec Salmonella typhi et que nous choisirons ici un modèle expérimental substitutif, celui de la souris infectée avec Salmonella typhimurium. La souris normale est naturellement sensible à cette salmonelle, qui produit chez elle une infection dont la symptomatologie et les modifications histo-pathologiques rappellent celles de la fièvre typhoïde humaine (26). Cette particularité nous a engagé, tout comme elle a déterminé d'autres chercheurs

(3, 10, 15, 16, 64), à tirer parti de cette situation. L'expérimentation sur la souris avec S. typhimurium devait être en mesure de fournir des conclusions applicables à la vaccination antityphoïdique de l'homme (3, 6, 29, 47, 49).

II. LE PROBLEME DE LA REVERSION VERS UNE FORME VIRULENTE; EXPERIMENTATION SUR SOURIS CD-1

AVEC S. typhimurium

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

(1) S. tym 779C - SmS est une souche de S. typhimurium virulente (DL 50 : 2×10^2 , par voie intrapéritonéale), streptomycino-sensible. Nous l'avons utilisée lors de travaux antérieurs (58, 63).

(2) S. tym 779C - SmD est un "one-step" mutant streptomycino-dépendant, obtenu de la souche précédente par la méthode de Paine et Finland (1948). Elle pousse abondamment en présence de streptomycine, exigeant pour son développement au moins 50 µg de streptomycine-base/ml de milieu de culture (tryptose-agar Difco). Le mutant tolère au minimum 20.000 µg d'antibiotique/ml de milieu. Il n'est pas dépendant d'autres aminosides contre lesquels il fut testé : néomycine et gentamicine.

(3) S. tym 779C - SmI rev. désigne les révertants streptomycino-indépendants obtenus à partir de S. tym 779C - SmD par ensemencement de ce mutant sur des plaques de Pétri contenant le milieu de culture dépourvu de streptomycine. Sur tryptose-agar Difco (privé d'antibiotique), la fréquence de la réversion est de 2 à 8 colonies pour 10^8 bactéries dépendantes après une incubation de 5 jours à 37°C.

Toutes les souches mentionnées sont "smooth"; elles possèdent les caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques typiques de S. typhimurium.

Animaux d'expérience

Les souris mâles CD-1, COBS (Caesarean Originated, Barrier-Sustained), pèsent initialement 24 - 26 g; elles proviennent des Centres d'élevage Charles River (Wilmington, Massachusetts). Elles sont réparties dans des cages d'acier inoxydable (jusqu'à 10 animaux par cage); la litière est constituée par une couche de sciure de bois. Nourriture : ration Charles River; eau de robinet à discrétion. Après stérilisation ou désinfection préalable, les cages sont nettoyées deux fois par semaine.

Détermination de la virulence

L'objet de cette épreuve est de tester la capacité des mutants SmD et SmI rev. de se multiplier dans l'organisme de la souris pour atteindre un niveau de croissance déterminant la mort de l'animal.

Le comportement de la souche S. tym 779C - SmD fut étudié aussi bien en présence qu'en l'absence de streptomycine. Les bactéries SmD provenaient de cultures âgées de 18 heures et obtenues sur tryptose-agar Difco + 1000 µg de streptomycine/ml.

Les clones de S. tym 779C - SmI rev. furent nombreux. Pour déterminer le niveau de la résistance à la streptomycine de chacune de ces colonies, nous suspendons la colonie dans 0,2 ml d'eau physiologique; puis, à l'aide d'une anse de platine d'un diamètre de 2 mm, nous déposons de petites gouttes de la suspension sur le tryptose-agar simple et sur du tryptose-agar additionné de streptomycine à des concentrations variables. Deux groupes de 30 colonies sont sélectionnés. Le groupe I comprend seulement des révertants qui manifestent un haut niveau de résistance à la streptomycine; le groupe II réunit des révertants offrant une gamme de phénotypes plus ou moins sensibles ou plus ou moins résistants. Les suspensions en eau physiologique des 30 colonies de chaque groupe sont mélangées. Pour la recherche de virulence, nous utilisons les mélanges initiaux des deux groupes de révertants, puis les sous-cultures de ces mélanges après leur premier et leur dixième passage sur trois milieux différents : (1) milieu de base

(tryptose-agar Difco) dépourvu de streptomycine, (2) milieu de base + 50 µg streptomycine/ml et (3) milieu de base + 1000 µg streptomycine/ml.

Lors du test de virulence, des lots de 10 animaux reçoivent, par animal et par voie intrapéritonéale, 0,5 ml de suspension bactérienne. La culture de départ a poussé 18 heures, à 37°C, sur tryptose-agar Difco avec ou sans antibiotique. Cette culture sert à préparer une suspension en eau physiologique possédant une turbidité de 10 unités internationales d'opacité (46); nous partons de là pour obtenir nos séries de dilutions de raison 10. Une partie des dilutions (A) est utilisée pour le test de virulence, l'autre (B) pour la numération des bactéries sur tryptose-agar Difco.

La mort des souris infectées est enregistrée journellement pendant 21 jours. Lors des essais préliminaires, les souris qui ont succombé à l'infection par *S. typhimurium* sont autopsiées; le sang du cœur et la rate sont mis en culture. Les cultures positives sont contrôlées sérologiquement quant à leur appartenance au type *S. typhimurium*. Tous les examens que nous avons pratiqués ont démontré que la cause de la mort relevait de *S. typhimurium*; aussi, par la suite, n'avons-nous effectué des autopsies que lors de cas spéciaux.

Après 21 jours, les souris survivantes sont sacrifiées. Leur rate est prélevée, puis broyée séparément et conservée en tubes contenant 0,5 ml d'eau physiologique. 0,1 ml de broyat est ensemencé sur plaque de gélose-SS Difco simple ou - le cas échéant - contenant de la streptomycine. Nous évaluons ainsi le total des bactéries par organe. L'identité des colonies est vérifié par agglutination sur lame.

Parallèlement au test de virulence exécuté avec la partie (A) des dilutions (cf. plus haut), nous effectuons avec la partie (B) des dilutions un comptage des germes vivants sur milieu avec et sans streptomycine. Une antibio-résistance est en outre déterminée à partir des suspensions à 10 unités internationales d'opacité.

RESULTATS

Les résultats des épreuves de virulence font l'objet des Tableaux I - VII. Les animaux à l'essai sont des souris CD-1 normales.

Tableau I. Virulence du mutant *S. tym* 779C-SmD en absence et en présence de Streptomycine

Animaux infectés	Germes inoculés i.p. ($\times 10^6$)	Streptomycine s. c. (0,5 ml)	Morts	Chez les survivants	
				présence de <i>S. tym</i> -Sm D dans la rate	rate
10	42	-	1 ^(b)	2 (15) ^(a)	+
10	4,2	-	0	0	N
10	42	10 mg pro die 5 jours ^(c)	0	9 (110)	+
10	4,2	10 mg pro die 5 jours ^(c)	0	9 (50)	+

(a) = Entre parenthèses : moyenne du nombre de germes récupérés par rate.

(b) = Hémo-culture négative et rate de dimensions normales.

(c) = Deux doses séparées par un intervalle d'environ 12 heures (la première dose est administrée 30 min avant l'infection).

i. p. = intrapéritonéal.

s. c. = sous-cutané.

N = rate normale; ±, +, ++, +++ : degrés d'augmentation de la rate.

Le Tableau I montre que le mutant S. tym 779C-Sm D est avirulent. Les animaux inoculés par voie intrapéritonéale résistent à des doses élevées, soit 42×10^6 bactéries vivantes. Dans des conditions similaires, la souche parentale S. tym 779C-Sm S tue tous les animaux en 2-4 jours. Le mutant S. tym 779C-Sm D reste avirulent même en présence de streptomycine, car tous les animaux infectés et recevant simultanément l'antibiotique survivent jusqu'à la fin de la période de contrôle. L'antibiotique, qui permet une croissance abondante "in vitro", n'a pas abouti "in vivo" à un développement létal des germes, malgré les doses élevées de bactéries Sm D inoculées.

Tableau II. Virulence des S. tym 779C-Sm I rev. (GROUPE I) et de leurs passages sur tryptose-agar simple

Suspension bactérienne	Animaux infectés	Germes inoculés ($\times 10^6$)	Morts	Chez les survivants	
				présence de <u>S. tym</u> dans la rate ^(b)	rate
initiale	10	16	8	2 (47,5) ^(a)	+++
	10	1,6	2	7 (42,5)	+
après 1 passage	10	29	10	-	-
	10	2,9	10	-	-
après 10 passages	10	20	10	-	-
	10	2,0	9	0	+++
	10	0,2	2	4 (30)	+++

(a) = Entre parenthèses : moyenne du nombre de germes récupérés par rate.

(b) = Récupération sur gélose-SS simple.

N, +, ..., +++ : cf. légende Tableau I.

Après l'infection, les animaux n'ont manifesté que de faibles signes de souffrance au cours des 12-24 heures qui suivirent.

La recherche du germe infectant à partir de la rate des animaux survivants (Tableau I) montre une multiplication des bactéries Sm D induite par la présence de l'antibiotique, mais ce processus, venons-nous de voir, n'est pas à même de forcer les défenses de l'organisme et de causer la mort.

Tous les germes isolés des animaux survivants ont conservé leur Sm D; aucune colonie Sm I ne fut rencontrée.

On conclura encore du Tableau I que les bactéries Sm D sont capables de persister longtemps dans les tissus de l'animal, même en l'absence de la streptomycine.

Les Tableaux II-VII sont consacrés aux épreuves de virulence concernant les mutants S. tym 779C-Sm I rev. Testée immédiatement après leur isolement, la virulence de ces mutants était réduite. Ces révertants Sm I, comparés à la souche S. tym 779C-Sm S, accusent aussi une perte de virulence. Toutefois, par la suite, les révertants Sm I se comportent assez différemment, selon que leur subculture est réalisée sur tryptose-agar Difco simple ou sur ce même milieu, mais additionné de streptomycine. En effet, on observe une augmentation de virulence après passages sur le milieu simple (Tableaux II et III) alors que,

Tableau III. Virulence des *S. tym* 779 C-Sm I rev. (GROUPE II) et de leurs passages sur tryptose-agar simple

Suspension bactérienne	Animaux infectés	Germe inoculés ($\times 10^6$)	Morts	Chez les survivants	
				présence de <i>S. tym.</i> dans la rate ^(b)	rate
initiale	10	12	8	2 (5) ^(a)	+++
	10	1,2	0	5 (15)	+++
après 1 passage	10	36	9	0	N
	10	3,6	10	-	-
après 10 passages	10	39	10	-	-
	10	3,9	10	-	-
	10	0,39	4	3 (18)	+++

Légende : cf. Tableau II.

après passages analogues sur le même milieu mais renfermant l'antibiotique (Tableaux IV - VII), la virulence a cessé d'augmenter; elle a même presque complètement disparu. Les différences observées à propos de la létalité sont statistiquement significatives (test χ^2 ; $P < 0,01$).

L'augmentation de la virulence s'exprime par l'augmentation de la létalité et la sévérité des signes d'infection (apathie prolongée, diminution de l'appétit, perte de poids); les rates recueillies chez les animaux survivants sont fortement hypertrophiées et permettent fréquemment de récupérer le germe inoculé.

La virulence des germes cultivés à partir des broyats de rate et provenant d'animaux survivants (Tableau II; 10 passages successifs sur milieu simple) fut aussi contrôlée; la DL50 était de 8×10^5 . A la fin de la période de contrôle (21 jours), avant d'être sacrifiés, les survivants étaient porteurs intestinaux du germe d'origine; ce germe avait alors une DL50 de 8×10^4 . Quant à la virulence des germes isolés par hémoculture à partir de souris mortes et appartenant au même groupe, elle s'exprimait par une DL50 de $5,5 \times 10^5$. Ces consta-

Tableau IV. Virulence des *S. tym* 779 C-Sm I rev. (GROUPE I) après culture sur tryptose-agar + 50 μ g de streptomycine/ml

Suspension bactérienne	Animaux infectés	Germe inoculés ($\times 10^6$)	Morts	Chez les survivants		
				présence de <i>S. tym</i> dans la rate, sur		rate
				gélose-SS simple	gélose-SS + 50 μ g Sm/ml	
1 passage	10	50	2	8 (21) ^(a)	3 (6)	+++
	10	5,0	0	2 (85)	2 (22,5)	N
10 passages	10	33	0	1 (35)	1 (45)	+
	10	3,3	0	0	0	N

Légende : cf. Tableau II.

Tableau V. Virulence des S. tym 779 C-Sm I rev. (GROUPE II) après culture sur tryptose-agar + 50 µg de streptomycine/ml

Suspension bactérienne après	Animaux infectés	Germes inoculés (x 10 ⁶)	Morts	Chez les survivants		
				présence de <u>S. tym</u> dans la rate, sur		rate
				gélose-SS simple	gélose-SS + 50 µg Sm/ml	
1 passage	10	18	0	4 (7,5) ^(a)	1 (10)	+++
	10	1,8	0	3 (15)	0	+
10 passages	10	37	0	0	0	N
	10	3,7	0	0	0	N

Légende : cf. Tableau II.

tations font ressortir qu'il existe une récupération de virulence à travers les révertants. Pour s'exprimer, cette réversion exige des circonstances spéciales : une subculture des révertants sur milieu dépourvu de streptomycine; elle est partielle et assez stable. A l'opposé, la subculture en présence de l'antibiotique entrave les processus de récupération de virulence.

D'autres observations intéressantes concernent les seuils de résistance à la streptomycine (Tableaux VIII et IX) et les comptages de révertants vivants (Tableaux X et XI).

Le comportement des révertants Sm I (Tableaux VIII et IX) varie considérablement au fil des cultures. Après passages sur milieu simple, les révertants perdent graduellement leur streptomycino-résistance initiale et se comportent comme la souche originaire S. tym 779C-Sm S. Au contraire, la culture en présence de streptomycine maintient le haut niveau initial de résistance vis-à-vis de l'antibiotique. Plus encore, les passages sur un milieu contenant 1000 µg/ml de streptomycine induisent le retour à l'état de dépendance (Tableaux VI - XI).

Tableau VI. Virulence des S. tym 779 C-Sm I rev. (GROUPE I) après culture sur tryptose-agar + 1000 µg de streptomycine/ml

Suspension bactérienne après	Animaux infectés	Germes inoculés (x 10 ⁶)	Morts	Chez les survivants		
				présence de <u>S. tym</u> dans la rate, sur		rate
				gélose-SS simple	gélose-SS + 1000 µg Sm/ml	
1 passage	10	37	0	0	3 (11,5) ^(a)	N
	10	3,7	0	0	3 (5)	N
10 passages	10	42	0	0	2 (7,5)	N

Légende : cf. Tableau II.

Tableau VII. Virulence des S. tym 779 C-Sm I rev. (GROUPE II) après culture sur tryptose-agar + 1000 µg de streptomycine/ml

Suspension bactérienne après	Animaux infectés	Germe inoculés (x 10 ⁶)	Morts	Chez les survivants		
				présence de <u>S. tym</u> dans la rate, sur		rate
				géluse-SS simple	géluse-SS + 1000 µg Sm/ml	
1 passage	10	47	0	0	9 (30) ^(a)	+
	10	4,7	0	0	3 (5)	N
10 passages	10	43	0	0	1 (10)	+

Légende : cf. Tableau II.

DISCUSSION

Les doses choisies pour les épreuves de virulence par voie intrapéritonéale, sont suffisamment élevées pour démontrer l'avirulence d'une souche de S. typhimurium. L'adoption de doses plus fortes aurait pu engendrer des erreurs imputables aux propriétés "toxiques" des microorganismes inoculés. Schewe (1958) a relevé que le total de S. typhimurium vivantes et dénombrées chez une souris morte par l'infection de cette salmonelle se situait invariablement entre 10⁹ et 10¹⁰ cellules bactériennes; une population bactérienne si riche possède

Tableau VIII. Seuils de résistance à la streptomycine des S. tym 779 C-Sm I rev. (GROUPE I).

Culture préalable sur tryptose-agar	Suspension bactérienne (a) après ... passage(s)	Concentration de la streptomycine en µg/ml de tryptose-agar										
		0	5	10	20	50	100	200	500	1000	5000	20000
Simple	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	++	+	1	0	1	3	2	1
+ 50 µg de Sm/ml	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 1000 µg de Sm/ml	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	±	±	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Témoins	<u>S. tym</u> 779 C-Sm S	+++	+++	+	4	1	0	0	0	0	0	0
	<u>S. tym</u> 779 C-Sm D	0	0	0	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(a) = 10 unités internationales d'opacité/ml.

+++ , ++ , + , ± , 0 = densité de la croissance bactérienne.

Les chiffres indiquent le nombre de colonies.

une toxicité suffisante pour provoquer la mort. Basant notre test de virulence sur la mort de l'animal imputable à la multiplication du germe infectieux, nous avons utilisé les doses de $10^7 - 10^8$ bactéries afin de réduire au minimum l'incidence de la toxicité : la survie à des doses aussi élevées marque l'incapacité du germe à se développer pour surmonter les forces de défense de l'animal; elle exprime l'avirulence de la souche.

Nos observations sur le comportement bénin des souches Sm D de *Salmonella* ne s'accordent que partiellement avec celles de Reitman (1967). Expérimentant sur la souris, cet auteur a trouvé que l'avirulence de la souche Sm D *S. typhi* 27 V relevait de la seule incapacité de se multiplier en l'absence de streptomycine; l'élément nutritif essentiel était-il disponible, la virulence redevenait semblable à celle des souches non-dépendantes. Dans nos essais, l'avirulence semble liée plutôt à un caractère génétique qu'à la dépendance envers

Tableau IX. Seuils de résistance à la streptomycine des *S. tym* 779C-Sm rev. (GROUPE II).

Culture préalable sur tryptose-agar	Suspension bactérienne (a) après ... passage(s)	Concentration de la streptomycine en µg/ml de tryptose-agar											
		0	5	10	20	50	100	200	500	1000	5000	10000	20000
Simple	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	+
	10	+++	+++	+++	++	±	2	2	2	1	1	5	4
+ 50 µg de Sm/ml	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
+ 1000 µg de Sm/ml	1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	1	1	1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Témoins	<i>S. tym</i> 779C-Sm S	+++	+++	+	4	1	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. tym</i> 779C-Sm D	0	0	0	±	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Légende : cf. Tableau VIII.

l'antibiotique. Par ailleurs, les conditions des travaux de Reitman sont assez différentes; l'auteur a étudié les réactions de la souris à l'infection intrapéritonéale par *S. typhi*, infection qui, contrairement à l'infection par *S. typhimurium*, ne ressemble pas à la fièvre typhoïde humaine. Chez Reitman, l'emploi de la mucine pour augmenter la virulence de *S. typhi* fait intervenir des facteurs additionnels qui s'expriment et sur l'organisme infecté et sur le microorganisme infectant (17); les mécanismes de défense sont bloqués, d'où création de conditions expérimentales artificielles (48). Dans des conditions naturelles, chez des volontaires humains (14), la souche *S. typhi* 27 V de Reitman n'a pas développé une virulence semblable à celle des souches non-dépendantes, malgré l'administration simultanée de streptomycine.

Le comportement des révertants *S. tym* 779C-Sm I qui surgissent en présence de streptomycine relève aussi d'une expression génétique. Il existe ici

Tableau X. Nombre de germes vivants : *S. tym* 779 C-Sm I rev. (GROUPE I).

Culture préalable sur tryptose-agar	Suspension bactérienne (a) après ... passage(s)	Nombre des germes vivants / ml ($\times 10^6$)		
		simple	Comptage sur tryptose-agar	
			+ 50 μ g de Sm/ml	+ 1000 μ g de Sm/ml
Simple	0	320	-	-
	1	580	-	-
	10	400	-	-
+ 50 μ g de Sm/ml	1	780	1000	-
	10	500	660	-
+ 1000 μ g de Sm/ml	1	560	-	740
	10	0,058	-	840

(a) = 10 unités internationales d'opacité/ml.

une corrélation évidente entre la virulence des révertants Sm I et le degré de sensibilité, ce qui corrobore les observations de Schnitzer et Grunberg (1957).

Le retour des révertants Sm I à l'état de Sm D mérite une attention spéciale. Ce comportement pourrait être expliqué par le fait que les révertants Sm I sont des mutants doubles chez lesquels la mutation initiale Sm D se conserve (24, 27). Le retour à la Sm D exprimerait le mécanisme majeur de stabilité de l'avirulence, assuré seulement par la présence de grandes quantités de streptomycine. Cette constatation justifie l'administration de doses élevées d'antibiotique lors de vaccination orale avec des souches vivantes Sm D; selon Cvjetanović et al. (1970), la multiplication intense des souches Sm D dans l'intestin

Tableau XI. Nombre de germes vivants : *S. tym* 779-Sm I rev. (GROUPE II).

Culture préalable sur tryptose-agar	Suspension bactérienne (a) après ... passage(s)	Nombre des germes vivants / ml ($\times 10^6$)		
		simple	Comptage sur tryptose-agar	
			+ 50 μ g de Sm/ml	+ 1000 μ g de Sm/ml
Simple	0	240	-	-
	1	720	-	-
	10	780	-	-
+ 50 μ g de Sm/ml	1	340	360	-
	10	460	740	-
+ 1000 μ g de Sm/ml	1	26	-	450
	10	0,00016	-	860

Légende : cf. Tableau X.

et, par voie de conséquence, l'efficacité d'une immunisation "in situ" dépend de la présence permanente et abondante de l'antibiotique.

Les deux groupes de révertants Sm I (Tableaux II - XI) se comportent d'une manière analogue, malgré la différence de résistance initiale à la streptomycine qui caractérise leurs composants (Cf: Matériel et méthodes). La bonne tolérance, chez la souris, des deux groupes de révertants cultivés en présence de streptomycine corrobore l'absence de réactions indésirables chez les volontaires et les chimpanzés. Le décours des essais appuie notre thèse d'utiliser le test des mélanges préparés "in vitro".

Nos observations semblent correspondre à ce qui se passe "in vivo" chez l'homme et chez les chimpanzés (12,14). En effet, les doses de vaccin utilisées chez l'homme (10^{10} - 10^{11} germes) et la fréquence de la réversion à Sm I, permettent d'estimer que le nombre de révertants dans les doses de vaccin était supérieur à 10^2 . Durant ces essais, il existait donc - avec la plus grande vraisemblance - des révertants doués de propriétés diverses et dont l'état final était déterminé par leur évolution à l'état de mélange.

L'extrapolation sur l'homme des observations recueillies chez la souris n'est pas sans danger, avons-nous vu, et nous considérons donc les résultats de la présente étude en tant qu'informations d'orientation. Même si notre modèle avec S. typhimurium est un test profitable, nous aurons pour le transposer sur S. typhi à contrôler sur des volontaires chaque souche vivante de S. typhi Sm D destinée à la vaccination orale de l'homme.

Considérons maintenant la vaccination antityphoïdique avec des souches vivantes Sm D, et demandons-nous si la récupération de la virulence à travers les révertants constitue un réel danger ? La réponse exige que l'on envisage, séparément, les deux principaux modes d'application du vaccin : la voie sous-cutanée et la voie orale.

Voie sous-cutanée. L'administration simultanée d'antibiotique ne semble pas indiquée par cette voie. Trois facteurs pourraient favoriser le retour à une forme virulente : (1) le degré de virulence des révertants, (2) le nombre de ceux-ci et (3) le degré de sensibilité de l'organisme-hôte. Dans notre système expérimental, un danger réel ne surgit que si le nombre des révertants atteint 10^5 - 10^6 , ce qui présuppose l'administration d'une quantité de bactéries Sm D beaucoup plus grande que celle habituellement employée. Cependant, une généralisation serait risquée : Baron et Formal (1960), opérant sur des souris Bagg avec un mutant Sm D dérivé d'une S. typhimurium virulente, ont noté que certaines souris inoculées i. p. avec 10^7 bactéries succombaient en moins de trois semaines, les cultures post-mortem révélant la présence de S. typhimurium Sm I. Comme la fréquence de réversion du mutant Sm D à la Sm I était de 10^{-7} , les auteurs en conclurent que déjà la présence d'un seul révertant était indésirable. Shuster et al. (1971) ont étudié la virulence de révertants issus de souches Sm D de S. enteritidis et S. typhimurium : environ 85% des révertants sont restés avirulents; parmi le 15% restant, la virulence fut récupérée partiellement ou totalement, la fréquence des révertants avec récupération complète de virulence était très basse, 1/82 pour S. enteritidis et 0/107 pour S. typhimurium.

La conclusion que suggèrent ces observations est la suivante : lors de l'immunisation par voie sous-cutanée, sans administration de streptomycine, une récupération complète de virulence est possible, mais seulement à un degré relativement faible.

Voie orale. Ici le risque d'une réversion complète à la virulence semble écarté. L'administration simultanée de streptomycine y trouve son indication majeure. Notre présente étude fait ressortir les mécanismes probables grâce auxquels la présence de streptomycine entrave la formation de révertants et particulièrement la sélection de révertants virulents. Nous savons qu'une sélection de révertants est entravée grâce à la présence de l'antibiotique dans l'intestin, mais que se passe-t-il - en fin d'immunisation - quand des bactéries SmD trouvent des conditions similaires à celles qui "in vitro" favorisent la récupération de virulence ? L'étude de ce problème exigeait la mise en place d'un modèle expérimental de vaccination orale; malheureusement, les souris CD-1 se sont montrées résistantes à l'infection orale par S. typhimurium; elles étaient inutilisables pour les essais que nous nous propositions. Parmi les autres souches de souris que nous avons étudiées, l'une, la souche C57 BL/6 manifestait une sensibilité remarquable à l'infection orale; elle nous permit d'entreprendre les essais qui sont rapportés ci-après.

III. MODELE EXPERIMENTAL DE VACCINATION ORALE

SUR DES SOURIS C57 BL/6 AVEC S. typhimurium

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

(1) S. tyim 779C-SmD : même souche qui fut utilisée dans les expériences relatées plus haut.

(2) Révertants S. tyim 779C-Sm I, avec virulence partiellement récupérée, obtenus dans des conditions décrites dans le Chapitre II. Pour la souris C57 BL/6, la dose létale minimum par voie orale était d'environ 10^7 germes.

Animaux d'expérience. Des souris femelles, "germ-pathogen free", C57BL/6, pesant 18 g, ont été obtenus des Centres d'élevage Charles River; elles étaient logées et nourries dans des conditions décrites dans le Chapitre II.

Modèle expérimental de vaccination orale. 20 souris C57BL/6 reçoivent par voie orale 5 doses d'environ 10^9 bactéries (0,5 ml) de S. tyim 779C-SmD à des intervalles de 48 heures. Le vaccin est introduit directement dans l'estomac à l'aide d'un tube métallique recourbé et ajusté sur une seringue à tubercule de 2 ml; il provient de cultures maintenues 18 heures à 37°C sur tryptose-agar Difco contenant, par ml, 1000 µg de streptomycine. Après détermination turbidimétrique de la suspension mère, nous préparons les dilutions convenables en eau physiologique; le nombre de germes viables est contrôlé par dénombrement des colonies sur plaques de tryptose-agar Difco.

Durant la période de vaccination, 36 heures avant et 36 heures après (11 jours en tout) les animaux consomment en permanence de la streptomycine dans l'eau de boisson (10 mg/ml).

Le développement des germes S. tyim 779C-SmD dans l'intestin des animaux vaccinés et une éventuelle sélection de révertants Sm I "in vivo" en cours de vaccination sont recherchés par coprocultures quantitatives, chaque jour pendant 20 jours, le premier examen ayant lieu 24 heures avant l'administration de la streptomycine dans l'eau de boisson. Pour obtenir des fèces destinées aux coprocultures, nous immobilisons la souris en position verticale, tête en haut, et nous massons l'abdomen jusqu'à l'excrétion d'une boulette fraîche, recueillie dans un récipient stérile de poids connu. Les fèces de 10 souris sont réunies dans un même récipient. Nous obtenons ainsi deux mélanges de fèces. Chaque mélange est suspendu en eau physiologique à raison de 1 g de fèces par ml de liquide. Le nombre de germes vivants est évalué par inoculation de 0,1 ml de dilutions décimales sur EMB-agar Difco et SS-agar Difco avec ou sans 1000 µg/ml de streptomycine.

L'identité des colonies est vérifiée par agglutination sur lame avec un sérum spécifique. Quinze jours après la dernière coproculture, les souris sont sacrifiées; la rate est prélevée, puis cultivée selon le procédé décrit plus haut.

RESULTATS

Vingt-quatre heures après le début de l'administration de streptomycine dans l'eau de boisson, la flore intestinale est altérée; elle redevient normale, sur les milieux simples, un jour après le début de l'ingestion de la souche vaccinante. Sur les milieux contenant de la streptomycine, seule la souche Sm D se développe, à la concentration d'environ 10^9 bactéries par g de fèces. Par la suite, aussi longtemps que l'on fait ingérer le vaccin, des colonies appartenant à la flore normale apparaissent progressivement sur l'agar-EMB simple ou contenant de la streptomycine; la souche Sm D pousse avec la même intensité sur les deux milieux contenant l'antibiotique. Le dernier jour de l'administration orale de vaccin, des colonies qui appartiennent à la flore normale apparaissent également sur l'agar-SS streptomyciné. Quand l'antibiotique est supprimé de l'eau de boisson, le nombre des bactéries Sm D diminue graduellement et, le sixième jour, aucune forme n'est plus isolée.

Les deux mélanges de fèces examinés ont fourni des résultats analogues.

Au début de l'administration orale du vaccin, des révertants Sm I ont été rencontrés deux fois; leur fréquence est celle observée "in vitro" : 2 colonies pour 10^8 bactéries dépendantes. Après suppression de la streptomycine, aucun révertant Sm I n'est retrouvé.

Durant la période de vaccination orale, les souris ne présentent aucun symptôme d'infection. A l'examen des souris sacrifiées, S. typhimurium n'est jamais isolée de la rate des animaux.

DISCUSSION

Peu de temps après que nous eussions observé la grande susceptibilité des souris C57BL/6 à l'infection orale par S. typhimurium, nous avons lu la publication de Collins (1972). Cet auteur relève que les souris C57BL sont beaucoup plus sensibles que les souris CD-1 à l'infection par S. enteritidis; il considère que la sensibilité particulière des souris C57BL devrait permettre une meilleure mise au point de modèle expérimental pour la fièvre typhoïde. Nos observations sur le comportement de la souris C57BL/6 face à l'infection orale par S. typhimurium confirment cette évaluation.

Dans le modèle expérimental que nous avons développé, aucun révertant Sm I ne surgit, même après suppression de la streptomycine, ce qui suggère un rapprochement avec l'absence de réactions pathologiques chez les volontaires vaccinés avec S. typhi dans des conditions analogues (14, 31).

Un danger réel, - on l'a du moins supposé -, ne résulterait que si le nombre des révertants atteignait 10^7 , ce qui signifie que, dans l'intestin des souris à la fin de la période de vaccination, on devrait dénombrer une population totale

d'environ 10^{14} bactéries Sm D. L'extrême improbabilité d'une telle situation peut expliquer la bénignité des réactions observées. Peut-on généraliser les conclusions des résultats obtenus avec notre système ? Nous ne le pensons pas car, nous l'avons déjà évoqué plus haut, on a cité ci et là une récupération complète de virulence (3, 57).

Les résultats encourageants obtenus avec le modèle expérimental que nous venons de décrire nous ont suggéré d'élargir nos recherches. Nous nous sommes proposé, en particulier, d'étudier l'effet des vaccinations associées orale et sous-cutanée (méthode mixte). Des observations existent déjà à ce propos (10, 52, 53, 59, 63); elles résultent d'essais accomplis avec des vaccins corpusculaires à germes tués. Qu'en est-il lors de l'emploi de germes vivants ?

IV. EFFICACITE DE LA VACCINATION ORALE AVEC S. typhimurium CHEZ LA SOURIS C57 BL/6. ESSAI DE VACCINATION MIXTE : ORALE ET SOUS-CUTANEE

MATERIEL ET METHODES

Souches bactériennes

(1) Souche vaccinante : mutant S. tym 779C-SmD.

(2) Pour l'infection d'épreuve : souche parentale, virulente, S. tym 779C-SmS (DL50 : 10^4 , par voie orale, pour souris mâle C57 BL/6).

Animaux d'expérience. Les souris mâles C57 BL/6 "germ-pathogen free", pesant 18-20 g au début de l'expérience, proviennent des élevages Charles River. Répartis à raison de 6 par cage, les animaux sont entretenus et nourris comme il le fut mentionné dans le Chapitre II.

Immunisation. 72 souris sont immunisées conformément à notre modèle expérimental; toutefois les doses vaccinales sont deux fois plus concentrées (2×10^9) et contiennent aussi de la streptomycine (2000 µg/dose).

Onze jours après la dernière prise orale, la moitié des animaux reçoit en outre une injection sous-cutanée d'environ 2×10^6 bactéries vivantes de la même souche S. tym 779C-SmD.

Infection d'épreuve. Les souris immunisées par les deux méthodes (orale et mixte) sont mises à l'épreuve simultanément, soit 10 jours après l'inoculation sous-cutanée. L'infection a lieu par voie orale, selon la technique adaptée pour la vaccination. Les doses infectantes, en progression géométrique de raison 10, s'échelonnent selon les lots entre $2,4 \times 10^4$ et $2,4 \times 10^9$ germes virulents. Parallèlement, des lots de 6 souris normales, maintenues dans les mêmes conditions que les animaux vaccinés, reçoivent des doses plus faibles descendant jusqu'à $2,4 \times 10$. Les morts sont notées journellement pendant 21 jours. Le degré de virulence est exprimé en valeurs DL50 tant pour les animaux vaccinés que pour les témoins et les résultats sont évalués statistiquement selon la méthode de Litchfield et Wilcoxon (1949), modifiée par Bonet-Maury, Jude et Servant (1954), par comparaison deux à deux des DL50 enregistrées.

Le 22ème jour, les animaux survivants sont soumis à deux coprocultures successives (en bouillon-sélénite Difco avec passage sur gélose-SS Difco), opération qui a pour but de dépister d'éventuels porteurs de germes. Les animaux sont alors sacrifiés; les rates, traitées comme il le fut mentionné plus haut, sont cultivées sur des milieux simples et sur les mêmes milieux contenant 1000 µg/ml de streptomycine.

RESULTATS

Le Tableau XII résume les résultats obtenus. La vaccination orale et la vaccination mixte sont capables de conférer aux animaux une immunité apprée-

Tableau XII. Efficacité des vaccinations orale et mixte chez la souris C57 BL/6

Groupes comparés	DL 50 ($\times 10^4$)	Quotient	f	Différence statistique
Témoins (T)	1	V/T = 97	8,40	S
Vaccination orale (V)	97			
Témoins (T)	1	V'/T = 41	8,40	S
Vaccination mixte (V')	41			
Vaccination orale (V)	97	V/V' = 2,3	7,45	NS
Vaccination mixte (V')	41			

f = facteur des limites de confiance du quotient

S = significatif

NS = non significatif

ciable, de valeur sensiblement égale. Il existe une légère différence en faveur de la méthode orale simple, mais cette différence n'est pas statistiquement significative.

Nous avons trouvé que l'incidence du portage intestinal de S. typhimurium parmi les souris survivantes était de 25% pour les animaux immunisés par voie orale et de 11% pour ceux traités par la méthode mixte; la différence n'est pas non plus statistiquement significative (test χ^2_0). L'intensité du portage est en relation avec la concentration des doses infectantes car, quelle que soit la méthode d'immunisation, le portage apparaît surtout chez les animaux infectés par des doses élevées.

Les tentatives d'isoler S. typhimurium de la rate des animaux survivants ont montré seulement la présence de S. typhimurium non dépendantes; les rates étaient alors fortement hypertrophiées et provenaient d'animaux identifiés antérieurement comme étant porteurs intestinaux de S. typhimurium. Par contre, les survivants du groupe témoin n'ont jamais présenté de coproculture positive; leurs rates, de dimensions normales, n'ont jamais révélé la présence de S. typhimurium.

DISCUSSION

L'innocuité et l'efficacité d'un vaccin oral vivant Sm D antityphoïdique ont été expérimentalement reconnues chez des volontaires (14) et des chimpanzés (12). Les essais sur chimpanzés ont démontré le rôle de la streptomycine dans l'obtention d'une bonne immunité : les chimpanzés vaccinés et recevant simultanément de la streptomycine ont été protégés dans une certaine mesure contre l'infection ($2,6 \times 10^{10}$ S. typhi Ty₂, par voie orale); ils n'ont souffert que de symptômes bénins; un animal traité quotidiennement par l'antibiotique est resté

indemne. Les témoins et les chimpanzés qui n'avaient reçu que le vaccin ont contracté la maladie. Chez les volontaires vaccinés, la maladie suivit un dé-cours mitigé. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 4-6 doses de $3-10 \times 10^{10}$ S. typhi 27 V, Sm D, administrées une fois par semaine, précédées par l'absorption de 2 g de bicarbonate de soude et prises en même temps que 1 g de streptomycine. Le 47^{ème} jour après la dernière dose de vaccin, après ingestion de 10^5 bactéries virulentes (souche Quailles de S. typhi), la maladie se déclara chez 5 sujets parmi les 30 vaccinés (17%) et chez 13 sujets parmi les 26 témoins (50%). Chez 10 vaccinés (33%) et 19 témoins (76%), la coproculture fut au moins une fois positive.

Les résultats de nos expériences sur souris C57BL/6, avec S. typhimurium, offrent une similitude certaine avec les observations que nous venons de relater à propos des volontaires et des chimpanzés, bien que l'issue finale de l'infection d'épreuve n'ait pas été la même (mortalité chez la souris, morbidité chez l'homme et le chimpanzé). Le quotient DL50 animaux vaccinés/DL50 animaux témoins, montre clairement (Tableau XII) l'efficacité de la méthode orale et celle de la technique adoptée. Les souris ont assez bien toléré les doses vaccinales; sitôt après l'ingestion du vaccin, les animaux ont généralement présenté une altération passagère de leur état général, ce qui correspond aux observations recueillies chez les volontaires et les chimpanzés (flatulence ou légère constipation, mais sans aucune réaction significative).

L'efficacité de la méthode mixte n'est pas inférieure à celle de la simple méthode orale; elle déçoit plutôt si l'on s'en rapporte aux conclusions prometteuses de recherches antérieures sur le même sujet. Un essai réalisé sur une large base, il y a 18 ans, avec des vaccins corpusculaires à germes tués, dans une région d'endémie typhoïdique (52, 53), mettait en évidence la supériorité de la méthode mixte soit sur la méthode orale, soit sur la méthode sous-cutanée. A la même époque, nous avons nous-mêmes (63) opéré sur des souris DBA immunisées contre S. typhimurium avec un vaccin corpusculaire à germes tués; ces souris furent éprouvées avec la souche S. tym 779C-Sm S, c'est-à-dire avec la souche même que nous avons utilisée dans le présent travail : l'association des deux méthodes orale et sous-cutanée s'était avérée particulièrement efficace.

A quoi tient le défaut de concordance entre les conclusions des études antérieures et celles du présent travail ? A une résistance intrinsèque des sujets immunisés ? Il existe en effet une hétérogénéité parmi les vaccinés dans les zones d'endémie comme il en existe une entre les souris DBA et les souris C57BL/6. Les souris DBA jouissent d'une résistance de base naturelle; elles auraient pu mieux répondre au stimulus de la vaccination que les souris C57BL/6 dépourvues d'une telle résistance. Cette variabilité dans le comportement ressort de la thèse de Gowen (1960) : les effets de la vaccination sont liés aux facteurs de la résistance naturelle et dépendent aussi bien des génotypes de l'hôte que des génotypes du microorganisme. Nous avons déjà abordé ce point ailleurs (13, 60 - 62) relevant que le pouvoir protecteur des sérums humains est toujours puissamment potentialisé par la vaccination antityphoïdique, ce qui n'est pas le cas pour les sérums de lapin.

D'autres paramètres peuvent être invoqués pour tenter d'expliquer la différence qui nous préoccupe. L'infection d'épreuve des souris DBA fut faite par voie intrapéritonéale (précisément à cause d'une résistance marquée à l'infection par voie orale) alors que les souris C57BL/6 furent éprouvées par la voie digestive normale. En outre, l'intervalle entre l'immunisation orale et la vaccination sous-cutanée n'a pas été le même dans les deux essais; la dose vaccinale sous-cutanée fut 100 fois plus élevée chez les souris DBA. Aussi nous proposons-nous de reprendre nos essais avec la souris C57BL/6 pour contrôler le rôle de ces paramètres.

Notre étude incite à reconnaître que l'immunité induite par la vaccination orale est avant tout locale, qu'elle siège dans l'intestin et qu'elle est la conséquence de la présence abondante des germes vivants Sm D administrés en même temps que l'antibiotique. La streptomycine ne passe dans le sang qu'en proportion réduite et le dépassement de la paroi intestinale par les bactéries vaccinales est peu probable. Il fut aussi démontré que chez les animaux immunisés, les dimensions de la rate sont normales et que le germe vaccinant ne se retrouve pas dans cet organe. Ces constatations convergent vers une même interprétation, celle de l'origine locale de l'immunité.

Nous avons vu qu'après l'infection d'épreuve, à la fin de la période de contrôle, les coprocultures étaient négatives chez les témoins survivants. Relevons ici la sensibilité particulière des souris C57BL/6. L'issue de la maladie chez les animaux atteints est toujours létale. Si la rate des témoins survivants est de dimensions normales, sans présence de S. typhimurium, on doit en déduire que ces animaux n'ont pas contracté la maladie. Le comportement des animaux immunisés puis soumis à l'infection d'épreuve fut différent; des porteurs de germes se sont rencontrés parmi les survivants de ce groupe: il s'agissait d'animaux infectés à doses massives et qui, à l'autopsie, offraient invariablement une rate hypertrophiée et contenant des S. tym 779C-Sm S. Ces survivants ont donc réussi à surmonter l'infection, démontrant ainsi l'effet bénéfique de la vaccination.

Nous sommes ainsi amené à conclure que l'immunisation orale au moyen de souches vivantes Sm D de S. typhimurium est un procédé valable.

V. RESUME ET CONCLUSIONS

L'immunisation active contre les salmonelloses n'a pas encore trouvé de solution satisfaisante.

Les vaccins à germes tués, couramment utilisés, ont une efficacité réduite et provoquent des effets secondaires indésirables lors de leur administration parentérale. Les vaccins à germes vivants devraient constituer un progrès, mais leur utilisation a toujours été considérée comme dangereuse. Les acquisitions récentes de la génétique bactérienne ont ouvert de nouvelles voies d'approche. La possibilité de sélectionner des souches bactériennes streptomycino-dépendantes (Sm D) met à disposition des moyens qui semblent offrir une solution d'avenir. Toutefois, de telles souches devraient être génétiquement stables et ne pas comporter les risques d'un retour à une forme virulente. C'est précisément ce problème de la réversion que nous avons abordé dans notre étude, étude que nous avons prolongée par des recherches sur l'efficacité des vaccins vivants buccaux streptomycino-dépendants (Sm D).

Volontaires humains et primates supérieurs, sujets expérimentaux valables sont difficiles à réunir; c'est pourquoi nous avons choisi d'expérimenter sur de petits animaux, plus exactement sur la souris, et de recourir à Salmonella typhimurium qui, pour la souris, est dans une certaine mesure l'analogue de S. typhi pour l'homme. En fait, l'infection de la souris par S. typhimurium est utilisée depuis de nombreuses années comme modèle de la fièvre typhoïde; elle fournit des renseignements qui paraissent assez bien cadrer avec la pathologie de l'infection humaine.

Dans la première partie de nos essais, nous avons recherché chez la souris CD-1 une récupération de virulence imputable à une réversion de S. typhimurium Sm D. Nous sommes parti d'un mutant "one-step" Sm D issu d'une souche virulente streptomycino-sensible (Sm S). Puis, de la souche Sm D, nous avons préparé deux groupes de révertants streptomycino-indépendants (Sm I). La virulence de la souche Sm D et des révertants Sm I (Groupes I et II) fut contrôlée par injection intrapéritonéale de la souris (Cf. chapitre II, Matériel et méthodes).

La souche Sm D est restée avirulente, vraisemblablement à cause d'une mutation. Comparés à la souche d'origine, les révertants Sm I ont aussi accusé une perte de virulence mais, par la suite, ils ont présenté un comportement variable selon qu'ils étaient cultivés sur milieu simple ou contenant de la streptomycine; chez eux, l'augmentation de virulence va de pair avec une chute de streptomycino-résistance quand les passages ont lieu sur un milieu de culture simple; par contre, après passages sur milieux contenant de l'antibiotique, la virulence a non seulement cessé d'augmenter, mais elle a presque complè-

tement disparu. La présence de streptomycine détermine aussi le maintien du haut niveau initial de résistance. Nous avons en outre observé que le milieu contenant 1000 µg de streptomycine/ml induisait le retour à l'état de dépendance.

Pour contrôler les germes Sm D dans l'intestin des animaux vaccinés et mettre en évidence une éventuelle sélection de révertants Sm I "in vivo", dans les conditions de vaccination, il devenait nécessaire de recourir à un modèle expérimental de vaccination par voie buccale. Comme les souris CD-1 se montrèrent résistantes à l'infection expérimentale par voie digestive, nous avons utilisé le couple souris C57BL/6 et S. typhimurium.

Ce modèle expérimental nous a permis d'étudier, dans des conditions particulièrement favorables, l'efficacité de la vaccination orale avec des germes vivants Sm D. Nous avons complété nos essais en associant les voies sous-cutanée et orale (vaccination mixte).

Dans l'hypothèse d'un parallélisme entre l'infection à S. typhi chez l'homme avec l'infection à Salmonelle typhimurium chez la souris, nos essais conduisent aux conclusions suivantes :

1) Le couple : souris C57BL/6 et S. typhimurium constitue un modèle qui permet d'obtenir par administration orale une infection analogue à la fièvre typhoïde humaine; il offre ainsi de remarquables possibilités d'expérimentation.

2) Les résultats obtenus sur souris CD-1 et surtout sur souris C57BL/6, avec S. typhimurium, marquent une similitude indubitable avec les observations recueillies chez des volontaires humains et chez le chimpanzé. Toutefois les faits décrits chez la souris doivent être extrapolés sur l'homme avec prudence. Même si notre modèle de travail avec S. typhimurium constitue un test profitable, il est indispensable, en dernière instance, de contrôler sur des volontaires chaque souche de S. typhi destinée à la vaccination orale.

3) La vaccination orale antityphoïdique avec des germes vivants Sm D suit un cours favorable, sans risque de réversion complète, grâce à la présence de la streptomycine administrée en même temps que les germes Sm D.

4) Le retour des révertants Sm I à la forme Sm D représente probablement le mécanisme majeur qu'explique la stabilité de l'avorulence des vaccins vivants oraux basés sur l'usage de salmonelles Sm D; mais ce retour se réalise seulement en présence de doses élevées de streptomycine.

5) Les probabilités d'une réversion demeurent très faibles, même après cessation de l'administration de streptomycine.

6) Dans nos conditions expérimentales, soit la vaccination orale, soit la vaccination mixte (orale - sous-cutanée) sont capables de conférer aux animaux une immunité appréciable et de valeur sensiblement égale.

7) L'immunité induite par la vaccination orale chez la souris C57BL/6 semble surtout locale, siégeant au niveau de l'intestin; elle est la conséquence de la présence abondante des germes vivants Sm D administrés en même temps que l'antibiotique.

VI. BIBLIOGRAPHIE

(concernant la seule partie expérimentale)

1. ARCHER, J.R. and RAWLEY, D. (1969). A quantitative comparison of the antigenic structure of a virulent and avirulent strain of Salmonella typhimurium. *Immunology* **17**, 551-558.
2. BACON, G.A., BURROWS, T.W. and YATES, M. (1951). The effects of biochemical mutations on the virulence of Bacterium typhosum. *British Journal of Experimental Pathology* **32**, 85-96.
3. BARON, L.S. and FORMAL, S.B. (1960). Immunisation studies with living vaccine of Salmonella typhimurium. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **104**, 565-567.
4. BESREDKA, A. (1910). De la vaccination par les virus sensibilisés. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **8**, 241-253.
5. BESREDKA, A. (1913). Deux ans de vaccination antityphique avec du virus sensibilisé vivant. *Annales de l'Institut Pasteur* **22**, 607-619.
6. BLANDEN, R.V., MACKANESS, G.B. and COLLINS, F.M. (1966). Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *Journal of Experimental Medicine* **124**, 585-600.
7. BONET-MAURY, P., JUDE, A. et SERVANT, P. (1954). La mesure statistique de la virulence et de l'immunité. Application à l'étude de la virulence du bacille typhique et à la mesure du pouvoir immunisant des vaccins antityphoïdiques. *Revue d'Immunologie (Paris)* **18**, 21-49.
8. CIUCA, M., COMBIESCU, D. et BALTEANU, J. (1915). Deux épidémies de fièvre typhoïde. Vaccinations antityphiques au virus sensibilisé vivant de Besredka. *Annales de l'Institut Pasteur* **29**, 105-115.
9. COLLINS, F.M. (1972). Salmonellosis in orally infected specific pathogen-free C57BL mice. *Infection and Immunity* **5**, 191-198.
10. COMBIESCU, D., COMBIESCU, C. et VLADOIANU, I.R. (1956). Vaccinarea în bolile enterice. Cercetări experimentale. Introducerea vaccinului pe diferite căi. Studii și Cercetări de Infarmacobiologie, Microbiologie și Parazitologie (București) **7**, 131-135.
11. COOPER, G.N. and FAHEY, K.J. (1970). Oral immunization in experimental salmonellosis. III. Behaviour of virulent and temperature-sensitive mutant strains in the intestinal tissues of rats. *Infection and Immunity* **2**, 192-200.
12. CVJETANOVIC, B., MEL, D.M. and FELSENFELD, D. (1970). Study of live typhoid vaccine in chimpanzees. *Bulletin of the World Health Organization* **42**, 499-507.
13. DIMACHE, G., VLADOIANU, I.R., DIMACHE, V. et POPESCO, P. (1971). Etude expérimentale complexe sur la vaccination anti-Salmonella typhi. Pouvoir protecteur pour la souris et l'embryon de poulet des sérums humains et de lapin. *Annales de l'Institut Pasteur* **120**, 817-829.
14. DU PONT, H.L., HORNICK, R.B., SNYDER, M.J., LIBONATI, J.P. and WOODWARD, T.E. (1970). Immunity in typhoid fever: Evaluation of live streptomycin-dependent vaccine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **10**, 236-239.
15. FAHEY, K.J. and COOPER, G.N. (1970). Oral immunization against experimental salmonellosis. I. Development of temperature-sensitive mutant vaccines. *Infection and Immunity* **1**, 263-270.
16. FAHEY, K.J. and COOPER, G.N. (1970). Oral immunization in experimental salmonellosis. II. Characteristics of the immune response to temperature-sensitive mutants given by oral and parenteral routes. *Infection and Immunity* **2**, 183-191.
17. FELIX, A. (1951). The preparation, testing and standardization of typhoid vaccine. *Journal of Hygiene* **49**, 268-287.

18. FORMAL, S.B., KENT, T.H., MAY, H.C., PALMER, A., FALKOW, S. and LA BREC, F. H. (1966). Protection of monkeys against experimental shigellosis with a living attenuated oral polyvalent dysentery vaccine. *Journal of Bacteriology* **92**, 17-22.
19. FORMAL, S.B., LA BREC, E.H., KENT, T.H. and FALKOW, S. (1965). Abortive intestinal infection with an *Escherichia coli*-*Shigella flexneri* hybrid strain. *Journal of Bacteriology* **89**, 1374-1382.
20. FORMAL, S.B., LA BREC, E.H., PALMER, A. and FALKOW, S. (1965). Protection of monkeys against experimental shigellosis with attenuated vaccines. *Journal of Bacteriology* **90**, 63-68.
21. FURNESS, G. and ROWLEY, D. (1956). Transduction of virulence within the species *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology* **15**, 140-145.
22. GERMANIER, R. (1970). Immunity in experimental salmonellosis. I. Protection induced by rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* **2**, 309-315.
23. GERMANIER, R. and FÜRER, E. (1971). Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of galE mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* **4**, 663-673.
24. GOLDSCHMIDT, E.P., MATNEY, T.S. and BAUSUM, H.T. (1962). Genetic analyses of mutations from streptomycin dependence to independence in *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **47**, 1475-1487.
25. GOWEN, J.W. (1960). Genetic effects in nonspecific resistance to infectious disease. *Bacteriological Reviews* **24**, 192-200.
26. GRABAR, J. (1959). Action sur les tissus de la souris de certains vaccins, préparés avec des souches de *Salmonella* pathogènes et non pathogènes pour cet animal. *Annales de l'Institut Pasteur* **96**, 577-590.
27. HASHIMOTO, K. (1960). Streptomycin resistance in *Escherichia coli* analysed by transduction. *Genetics* **45**, 49-62.
28. HERZBERG, M. (1962). Living organisms as immunizing agents against experimental salmonellosis in mice. I. Virulence of auxotrophic mutants. *Journal of Infectious Diseases* **111**, 192-203.
29. HOBSON, D. (1957). Resistance to reinfection in experimental mouse typhoid. *Journal of Hygiene* **55**, 334-343.
30. HORNICK, R.B. and DU PONT, H.L. (1970). Oral live virus typhoid vaccine tests show promise. *Journal of the American Medical Association* **214**, 991.
31. HORNICK, R.B., GREISMAN, S.E., WOODWARD, T.E., DU PONT, H.L., DOWKINS, A.T. and SNYDER, M. (1970). Medical progress. Typhoid fever : pathogenesis and immunological control. *New England Journal of Medicine* **283**, 686-691, 739-746.
32. ISTRATI, G. (1961). Recherche sur l'immunité active de l'homme dans la dysenterie bacillaire. I. Note. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* **20**, 53-62.
33. ISTRATI, G., ISTRATI, M., MEITERT, T. et CIUFECU, C. (1965). Stabilité génétique du caractère non-pathogène et immunogène antiinfectieux de quelques souches de *Shigella flexneri* 2a. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* **24**, 867-874.
34. ISTRATI, G., MEITERT, T. et CIUFECU, C. (1965). Recherches sur l'immunité active de l'homme dans la dysenterie bacillaire. Note III. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* **24**, 677-686.
35. ISTRATI, G., MEITERT, T. et CIUFECU, C. (1965). Innocuité de la souche vivante et non-pathogène *Shigella flexneri* 2aT XXXII administrée par voie sous-cutanée et intramusculaire à des volontaires. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* **24**, 875-878.
36. ISTRATI, G., MEITERT, T. and CIUFECU, C. (1968). Treatment of dysentery bacilli carriers with a live non-pathogenic antidysenteric vaccine. *Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis* **16**, 333-337.

37. ISTRATI, G., MEITER, T., CIUFECU, C. et FILIPESCO, S. (1964). Recherches sur l'immunité active de l'homme dans la dysenterie bacillaire. Note II. Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie 23, 141-148.
38. LITCHFIELD, J.T. and WILCOXON, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 96, 99-113.
39. KENNY, K. and HERZBERG, M. (1967). Early antibody response in mice to either infection or immunization with Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 93, 773-778.
40. KISHIMOTO, Y. (1965). Live vaccine immunization in experimental typhoid with a str. d strain of S. enteritidis. Japanese Journal of Bacteriology 20, 195-202.
41. MEL, D.M., ARSIC, B.L., NICOLIC, B.D. and RADOVANOVIC, M.L. (1968). Studies on vaccination against bacillary dysentery. 4. Oral immunization with live monotypic and combined vaccines. Bulletin of the World Health Organization 39, 375-380.
42. MEL, D.M., GANGAROSA, E.J., RADOVANOVIC, M.L., ARSIC, B.L. and LITVINJENCO, S. (1971). Studies on vaccination against bacillary dysentery. 6. Protection of children by oral immunization with streptomycin-dependent shigella strains. Bulletin of the World Health Organization 45, 457-464.
43. MEL, D.M., PAPO, R.G., TERZIN, A.L. and VUKSIC, L. (1965). Studies on vaccination against bacillary dysentery. 2. Safety tests and reactogenicity studies on a live dysentery vaccine intended for use in field trials. Bulletin of the World Health Organization 32, 637-645.
44. MEL, D.M., TERZIN, A.L. and VUKSIC, L. (1965). Studies on vaccination against bacillary dysentery. I. Immunization of mice against experimental shigella infection. Bulletin of the World Health Organization 32, 633-636.
45. MEL, D.M., TERZIN, A.L. and VUKSIC, L. (1965). Studies on vaccination against bacillary dysentery. 3. Effective oral immunization against Shigella flexneri 2a in a field trial. Bulletin of the World Health Organization 32, 647-655.
46. ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTE (1954). Comité d'experts pour la Standardisation biologique. Séries de Rapports Techniques No 86, p. 14.
47. ORGANIZATION MONDIALE DE LA SANTE (1972). Les vaccins buccaux contre les entérobactéries. Rapport d'un groupe scientifique de l'OMS. Séries de Rapports Techniques No 500.
48. ORSKOV, J. (1940). Infektionsmechanische Untersuchungen über unspezifische, lokale, gesteigerte bzw. herabgesetzte Resistenz (Promunität bzw. Mucin). Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie 98, 359-372.
49. ORSKOV, J., JENSEN, K.A. und KOBAYASHI, K. (1928). Studien über Breslauinfektion der Mäuse, speziell mit Rücksicht auf die Bedeutung des Reticuloendothelialgewebes. Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie 55, 34-68.
50. PAINE, T.F. and FINLAND, M. (1948). Observations on bacteria sensitive to, resistant to and dependent upon streptomycin. Journal of Bacteriology 56, 207-218.
51. REITMAN, M. (1967). Infectivity and antigenicity of streptomycin-dependent Salmonella typhosa. Journal of Infectious Diseases 117, 101-107.
52. RUSU, V., NAS LIGIA, SUCIU, T., DORIN, P. et ULMEANU, C. (1958). Studiul eficientei vaccinării orale și mixte TAB, prin testul epidemiologic. Microbiologie, Parazitologie și Epidemiologie (București) 3, 257-268.
53. RUSU, V., VLADOIANU, I.R., NAS LIGIA, MUSCAN, S., BLASIU, H., DANCILA, E. et TOTESCO, E. (1958). Contribution à l'étude de l'efficacité des méthodes entérales de vaccination TAB. Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie 17, 45-62.
54. SCHEWE, E. (1958). Effects of modified host metabolism and altered defense mechanisms on survival time and pathogen counts in tissues and total body of mice infected intravenously with Salmonella typhimurium. Journal of Infectious Diseases 102, 275-293.
55. SCHNITZER, J.R. and GRUNBERG, E. (1957). Change of virulence of drug-resistant bacteria. In: Drug Resistance of Microorganisms, p. 157-167. - New York: Academic press.
56. SERGEEV, V.V., TARATORINA, O.M. and ELKINA, S.I. (1967). Pathogenic and immunogenic properties of Streptomycin-dependent mutant of Salmonella gartneri. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii 44, 56-60.

57. SHUSTER, B.Yu., SERGEEV, V.V., ELKINA, S.I., LIMAREV, V.A. and LIKHODED, V.G. (1971). Virulent properties of revertants of Streptomycin-dependent *Salmonella* mutants. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* 48, 29-32.
58. VLADOIANU, I.R. et DIMACHE, G. (1964). Comportement des souris DBA et H envers l'infection expérimentale avec *S. typhimurium*. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* 23, 59-62.
59. VLADOIANU, I.R. et DIMACHE, G. (1965). Contribuții românești la studiul vaccinării antitifoïdice pe cale orală. *Microbiologie, Parazitologie și Epidemiologie (București)* 10, 97-102.
60. VLADOIANU, I.R. et DIMACHE, G. (1966). Séro-protection de l'embryon de poulet contre l'infection à *Salmonella* du groupe typho-paratyphoïdique. Essais de perfectionnement de la méthode et possibilités de son application à l'étude de l'immunité. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* 25, 513-522.
61. VLADOIANU, I.R., DIMACHE, G., ANTOHI, S., VLADOIANU, C. and ZARMA, O. (1965). Laboratory tests on the effectiveness of oral vaccination of young children against typhoid and paratyphoid A and B. *Bulletin of the World Health Organization* 32, 37-45.
62. VLADOIANU, I.R., DIMACHE, G., POPESCO, P., MEREUTA, H., LÖWE, I., DINCOLESCO, M. et DIMACHE, V. (1965). Séro-protection de l'embryon de poulet contre l'infection à *Salmonella paratyphi* A. Application au contrôle des vaccins. *Annales de l'Institut Pasteur* 108, 246-254.
63. VLADOIANU, I.R., RUSU, V., NAS LIGIA et STREJNICO, F. (1960). Recherches expérimentales concernant la méthode mixte (orale-sous-cutanée) de la vaccination antityphoïdique. *Archives Roumaines de Pathologie Expérimentale et de Microbiologie* 19, 137-147.
64. WALDMAN, R.H., GRUNSPAN, R. and GANGULY, R. (1972). Oral immunization of mice with killed *Salmonella typhimurium* vaccine. *Infection and Immunity* 6, 58-61.

